

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07072154 A**

(43) Date of publication of application: **17.03.95**

(51) Int. Cl

**G01N 33/531
G01N 33/53
G01N 33/72**

(21) Application number: **05221430**

(22) Date of filing: **06.09.93**

(71) Applicant: **KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD**

(72) Inventor: **IMAI TSUGI
HOTTA IKUKO
KISHIOKA HIROSHI
KONISHI SHOHEI**

(54) METHOD FOR MEASURING HEMOGLOBIN

(57) Abstract:

PURPOSE: To restrain hemoglobin from being decomposed and to precisely measure the hemoglobin which has been preserved for a long time by a method wherein a non-penicillin-based antibiotic is made to coexist with a sample which contains the hemoglobin.

CONSTITUTION: A cephalosporin-based antibiotic such as cephalexin A, cephalosporin or the like or an aminoglycoside-based antibiotic such as streptomycin A, dehydrostreptomycin or the like is used as a non-penicillin-based antibiotic which is made to coexist.

A dejection, blood, urine or the like is used as a sample which contains hemoglobin, and the sample is used to measure the hemoglobin in a state that the non-penicillin-based antibiotic has been dissolved in a buffer solution or the like. The amount to be added of the non-penicillin-based antibiotic is to be set in such a way that the concentration of 0.005 to 0.5wt.%, preferably 0.01 to 0.2wt.%, is obtained in the buffer solution. After a sample solution has been preserved for 1 to 30 days at 4 to 50°C, it can be used to measure the hemoglobin.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-72154

(43)公開日 平成7年(1995)3月17日

(51)Int.Cl.⁸

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 33/531

B

33/53

K

33/72

A

審査請求 未請求 請求項の数2 OL (全5頁)

(21)出願番号

特願平5-221430

(22)出願日

平成5年(1993)9月6日

(71)出願人 000001029

協和醸酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 今井 翔

三重県四日市市桜花台1丁目33-12

(72)発明者 堀田 郁子

三重県四日市市生桑町2273-1

(72)発明者 岸岡 洋

三重県四日市市西日野町4817

(72)発明者 小西 章平

東京都世田谷区野沢1-12-5

(54)【発明の名称】 ヘモグロビンの測定方法

(57)【要約】

【目的】 大腸癌の診断に用いられる臨床検査法に有用な、糞便試料中のヘモグロビンの分解抑制方法を提供する。

【構成】 ヘモグロビン含有試料に、非ペニシリン系抗生物質を共存させることを特徴とするヘモグロビンの分解抑制方法および被検試料中のヘモグロビンの測定方法において、試料中に非ペニシリン系抗生物質を共存させることを特徴とする方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヘモグロビン含有試料に、非ペニシリン系抗生物質を共存させることを特徴とするヘモグロビンの分解抑制方法。

【請求項2】 被検試料中のヘモグロビンの測定方法において、試料中に非ペニシリン系抗生物質を共存させることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用方法】 本発明はヘモグロビン含有試料の長期保存を必要とする臨床検査法に有用なヘモグロビンの分解抑制方法に関する。該分解抑制方法を、ヘモグロビン含有試料の長期保存を必要とする臨床検査法に適用することにより、正確なヘモグロビンの測定方法が提供される。

【0002】

【従来の技術】 大腸癌等の消化器癌を検査する方法として、消化管からの出血に起因する糞便中の潜血成分（ヘモグロビン）を、抗ヘモグロビン抗体を用いた免疫学的測定法により測定する方法が行われている。これらの臨床検査方法においては、ヘモグロビンを含有した検便試料を長期間保存するため、保存期間中に試料中のヘモグロビンが分解し、正確にヘモグロビンを測定できないことがある。糞便中のヘモグロビンの分解を抑制する目的でペニシリンを添加する方法が開示されている（特開昭59-125064号公報）が、該方法によるヘモグロビンの分解抑制効果は必ずしも十分でない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 郵送検便試料による大腸癌の検診等が普及するに伴い、保存試料中のヘモグロビンの分解抑制方法の開発が望まれている。該分解抑制方法をヘモグロビン含有試料を長期間保存する臨床検査法に適用することにより、正確なヘモグロビンの測定が可能な臨床検査法が提供される。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明はヘモグロビン含有試料に非ペニシリン系抗生物質を共存させることを特徴とするヘモグロビンの分解抑制方法に関する。さらに本発明により、該ヘモグロビンの分解抑制法を適用し、被検試料中に非ペニシリン系抗生物質を共存させることを特徴とするヘモグロビンの測定法を提供することができる。

【0005】 本発明に用いる非ペニシリン系抗生物質としては、例えば、セファマイシンA、セファマイシンB、セファマイシンC、セファロスボリン、セファロチノニウム、セファレキシン、セファラジン、ヘタスピリン、セファビリン、ロラカルベフ等のセファロスボリン系抗生物質、ストレプトマイシンA、ストレプトマイシンB、デハイドロストレプトマイシン、オキシストレプトマイシン、カナマイシン、カスガマイシ

ン、ゲンタマイシンA、ゲンタマイシンC、リンコマイシン、ブレオマイシン、マンノシドハイドロオキシ・ストレプトマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質、ポリオキシンA、ポリオキシンB、ポリオキシンC、ポリオキシンD、ポリオキシンE、ポリオキシンF、ポリオキシンG、ポリオキシンH、ポリオキシンJ、ポリオキシンK、ポリオキシンL、ポリオキシンM、ツベルシン、フォルマイシンB等のヌクレオシド系抗生物質、アンサマイシン、リファマイシン、リファマイシンB、リ

10 フアマイシンL、リファマイシンS、リファマイシンV、リファマイシンY、リファムビシン等のアンサマイシン系抗生物質、ポリミキシン、グラマイシンA、グラマイシンB、グラマイシンC、ビオマイシン、バシトラシン、アクチノマイシン、チロシジンA、チロシジンB、チロシジンC、チロシジンD、チロシジンS、スタ

20 フィラマイシン等のポリペプチド系抗生物質、その他チクロヘキシミド、チクロセリン、ザルコマイシンA、スペクチノマイシン、クロラムフェニコール、ミトマイシン、プラスチシンS、フマジリン、モネシシン、ピローネルニトリン、フォスフォノマイシン等を用いることができるが、例えはミノサイクリン、テトラサイクリン、ハイドロオキシテトラサイクリン、クロノサイクリン、テラマイシン、ニトロサイクリン、アミサイクリン、アントラサイクリン、メタサイクリン、デオキシクリン、グリコサイクリン、アンハイドロテトラサイクリン等のテトラサイクリン系抗生物質、アセチルスピラマイシン、エリスロマイシン、ピクロマイシン、ビマリシン、レセンソマイシン、アンフォテリシンB、カンジシンA、カンジシンB等のマクロライド系抗生物質を用いることが好ましい。前記のヘモグロビンに添加する非ペニシリン系抗生物質は、単独または二種以上混合して、ヘモグロビン1に対して0.002～500万の重量比で用いられるが、ヘモグロビン1に対して0.004～200万の重量比で用いることが好ましい。

【0006】 ヘモグロビン含有試料は、ヘモグロビンを含有する試料であればどのようなものでもよいが、糞便、血液、尿、痰等を用いることが好ましい。

【0007】 被検試料は通常非ペニシリン系抗生物質を添加した緩衝液等に溶解した状態で、ヘモグロビンの測定に供せられる。非ペニシリン系抗生物質の添加量は、緩衝液中に0.005～0.5重量%、好ましくは0.01～0.2重量%の濃度になるように添加する。緩衝液としてはリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、イミダゾール緩衝液、グリシン緩衝液、トリス一塩酸緩衝液などが用いられ、これらの緩衝液はPH6.0～9.0、好ましくは6.5～8.5の範囲がよい。緩衝液中には塩化ナトリウム等の塩類、アルブミン等の安定化剤やアジ化ナトリウム等の抗菌剤、乳酸等を含んでもよい。

【0008】 緩衝液中に含有するアルブミンとしては、ヒト、ウサギ、羊、山羊、馬、牛、ブタ等の動物アルブ

ミン、卵白アルブミンがあげられる。非ペニシリン系抗生物質の効果を増強するため、緩衝液中にアルブミン、アジ化ナトリウム、乳酸等を加えるときは、アルブミン0.05～5重量%、好ましくは0.1～2重量%、アジ化ナトリウム0.05～0.5重量%、好ましくは0.1～0.3重量%、乳酸0.1～1.5重量%、好ましくは0.5～5.0重量%の濃度で加えることが好ましい。これらの添加剤は試料のヘモグロビンに対しては、ヘモグロビン1に対して重量比でアルブミン0.02～5000万、アジ化ナトリウム0.02～500万、乳酸0.04～1億5000万の比で用いればよい。

【0009】被検液はそのままヘモグロビンの測定法に供してもよいが、4～50°Cで1～30日間保存した後にヘモグロビンの測定法に供することも可能である。

【0010】本発明におけるヘモグロビンの測定方法としてはヘモグロビンの検出方法または定量法であればいずれでもよいが、例えば抗ヘモグロビン抗体を用いた免疫学的測定法等があげられる。

【0011】ヘモグロビンの免疫学的測定法としては、抗ヘモグロビン抗体を用いた免疫学的測定法であればどのようなものでもよく、例えば、寒天平板上で抗ヘモグロビン抗体と被検試料中のヘモグロビンとを反応させる単純免疫拡散法、二重免疫拡散法等の免疫拡散法や、抗ヘモグロビン抗体を感作した動物血球を用いる逆受身赤血球凝集法、酵素で標識した抗ヘモグロビン抗体を用いる酵素免疫法、抗ヘモグロビン抗体を感作したラテックス粒子を用いるラテックス凝集法、ラテックス凝集阻止法、抗ヘモグロビン抗体を感作した金コロイド粒子を用いる金コロイド凝集法等があげられる。

【0012】以下にラテックス凝集法を用いた場合の免疫学的測定法について例示する。

【0013】通常のポリクローナル抗体の作製方法（実験生物学講座14、「免疫生物学」、村松繁ら編、1985年、丸善刊）に従い、ヒトヘモグロビンを抗原としてウサギ、羊、山羊、等の抗体産生能のある動物を該抗原で免疫した後、採血する。採血後、通常用いられる精製方法（例えば、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAEセルロースでのIgG分画）で精製して抗ヒトヘモグロビン抗体を得る。なお抗ヒトヘモグロビン抗体は常法（モノクローナルとがん、谷内昭ら編、1985年、サイエンスフォーラム社刊；单クローン抗体、岩崎辰夫ら編、1984年、講談社サイエンティフィック社刊）等により作製したモノクローナル抗体を用いてもよいし、市販の抗ヒトヘモグロビン抗体を用いてもよい。

【0014】得られた抗体を物理吸着法または共有結合法〔タンパク質化学1（アミノ酸、ペプチド）、赤堀四郎ら編、1969年、共立出版刊〕等の常法によりラテックス粒子（0.1～0.6μm）に結合させ、牛血清アルブミン等を含む緩衝液などで遠心分離洗浄を行い抗

ヒトヘモグロビン抗体感作ラテックス試薬を作製する。【0015】この様にして得られたラテックス試薬を用い、スライド板法によりスライド板上での凝集像を判定する方法や、凝集反応の速度を分光光度計、濁度計等により光学的または電気的に測定する方法によってヒトヘモグロビンを測定する。

【0016】以下、本発明の実施例を示す。

【0017】

【実施例】

10 実施例1

(1) 抗ヒトヘモグロビン抗体感作ラテックス試薬の調製

ヒトヘモグロビンをウサギに免疫して作製したポリクローナルの抗ヒトヘモグロビン抗体2mgを含む0.2Mトリス一塩酸緩衝液（PH8.2）2mlと1%のポリスチレンラテックス〔粒径0.35μm；協和発酵工業社製〕を懸濁させた0.2Mトリス一塩酸緩衝液（PH8.2）2mlとを混合し、4°Cで24時間攪拌してラテックスに抗体を吸着させた。その後、遠心分離機を用いてラテックスを上記のトリス一塩酸緩衝液で洗い、ラテックスが1%になるように0.5%牛血清アルブミン（BSA）を含む0.2Mトリス一塩酸緩衝液（PH8.2）に懸濁させ、抗ヒトヘモグロビン抗体感作ラテックス試薬を調製した。

【0018】(2) 粪便溶解用緩衝液

糞便溶解用緩衝液として、アジ化ナトリウム0.1%、BSA0.2%、塩化ナトリウム0.85%が入った0.05Mホウ酸緩衝液（PH8.0）に、第1表に記載した量の非ペニシリン系の抗生物質を濃度を変えて溶解させた。

【0019】(3) 比較用緩衝液

(2) で作製した糞便溶解用緩衝液の比較対照として第1表に記載した量のペニシリンの入った0.05Mホウ酸緩衝液（PH8.0）を作製した。

【0020】(4) 対照用糞便溶解用緩衝液

(2) で作製した糞便溶解用緩衝液の対照としてアジ化ナトリウム0.1%、BSA0.2%、塩化ナトリウム0.85%が入った0.05Mホウ酸緩衝液（PH8.0）を作製した。

【0021】(5) 即時検出操作

(2) で調製した糞便溶解用緩衝液、(3) で調製した比較用緩衝液または(4) で作製した対照用糞便溶解用緩衝液にヒトヘモグロビンの濃度を変えて溶解し、更に健常人の糞便を6mg/ml濃度で溶解させた。この被検液100μlと前記ラテックス試薬25μlをスライド板上に滴下し、攪拌棒で両液を混和してスライド板の円一杯に広げた。スライド板を前後左右に3分間ゆるやかに動かした後、ラテックス試薬の凝集像を観察した。その結果を第1表に示した。

【0022】

【表1】

第1表

添加抗生物質		ヒトヘモグロビン濃度(ng/ml)						
名称	添加量%	4000	2000	1000	500	250	125	0
アセチルスピラマイシン	0.01	+	+	+	+	+	+	-
	0.05	+	+	+	+	+	+	-
	0.2	+	+	+	+	+	+	-
ミノサイクリン	0.01	+	+	+	+	+	+	-
	0.05	+	+	+	+	+	+	-
	0.2	+	+	+	+	+	+	-
ペニシリン	0.01	+	+	+	+	+	+	-
	0.05	+	+	+	+	+	+	-
	0.2	+	+	+	+	+	+	-
無添加		+	+	+	+	+	+	-

+ ; 強い凝集 ± ; 弱い凝集 - ; 凝集なし

【0023】第1表によれば、即時検出操作では本発明法、比較対照法、対照法のいずれの方法を用いても、ヒトヘモグロビン125ng/mlまで測定可能であった。

【0024】(7日保存後の検出) (2)で調製した糞便溶解用緩衝液、(3)で調製した比較用緩衝液、または(4)で作製した対照用糞便溶解用緩衝液にヒトヘモ*

*グロビンを濃度を変えて溶解し、更に健常人の糞便を6mg/ml濃度で溶解させた。得られた溶液を23°Cで20 7日間保存した後、(5)と同様の方法で前記ラテックス試薬を滴下し凝集像を観察した。結果を第2表に示した。

【0025】

【表2】

第2表

添加抗生物質		ヒトヘモグロビン濃度(ng/ml)						
名称	添加量%	4000	2000	1000	500	250	125	0
アセチルスピラマイシン	0.01	+	+	+	+	+	-	-
	0.05	+	+	+	+	+	-	-
	0.2	+	+	+	+	+	-	-
ミノサイクリン	0.01	+	+	+	+	+	-	-
	0.05	+	+	+	+	+	-	-
	0.2	+	+	+	+	+	-	-
ペニシリン	0.01	+	+	±	-	-	-	-
	0.05	+	+	±	-	-	-	-
	0.2	+	+	±	-	-	-	-
無添加		+	+	-	-	-	-	-

+ : 強い凝集 ± : 弱い凝集 - : 凝集なし

【0026】第2表によれば、抗生物質無添加の対照ではヘモグロビン2000ng/ml以上でヘモグロビンの検出が可能であった。比較例のヘモグロビンではこれより僅かに検出感度が向上しヘモグロビン1000ng/mlで弱い凝集による検出が可能であった。これに対し、アセチルスピラマイシンおよびミノサイクリンは、共に0.2%濃度でヘモグロビン125ng/mlの弱い凝集による検出が可能であり、0.01~0.05%濃度でもヘモグロビン250ng/mlの強い凝集によ

る検出が可能であり、比較例に比べ検出感度が格段に向上了した。

【0027】(6) 高温保存後の検出

(2)で調製した糞便溶解用緩衝液、(3)で調製した比較用緩衝液または(4)で作製した対照用糞便溶解用緩衝液にヒトヘモグロビンを濃度を変えて溶解し、更に健常人の糞便を6mg/ml濃度で溶解させた。得られた溶液を37°Cで1日間保存した後、(5)と同様の方法で前記ラテックス試薬を滴下し凝集像を観察した。結

果を第3表に示した。

【0028】

*【表3】

*

第3表

添加抗生物質		ヒトヘモグロビン濃度(ng/ml)						
名称	添加量%	4000	2000	1000	500	250	125	0
アセチルスピラマイシン	0.01	+	+	+	+	-	-	-
	0.05	+	+	+	+	±	-	-
	0.2	+	+	+	+	+	-	-
ミノサイクリン	0.01	+	+	+	+	±	-	-
	0.05	+	+	+	+	+	-	-
	0.2	+	+	+	+	+	-	-
ペニシリソ	0.01	+	±	-	-	-	-	-
	0.05	+	±	-	-	-	-	-
	0.2	+	-	-	-	-	-	-
無添加		+	-	-	-	-	-	-

+ ; 強い凝集 ± ; 弱い凝集 - ; 凝集なし

【0029】第3表によれば、抗生物質無添加の対照ではヘモグロビン4000ng/mlで検出可能であった。比較例のヘモグロビンではこれより僅かに検出感度が向上しヘモグロビン2000ng/mlで弱い凝集による検出が可能であった。これに対し、アセチルスピラマイシンおよびミノサイクリンは、ヘモグロビン250ng/mlの弱い凝集による検出が可能であり、比較例

に比べ検出感度が格段に向上了。

【0030】

20 【発明の効果】本発明の糞便試料中のヘモグロビンの分解抑制方法を、ヘモグロビン含有試料の長期保存方法に適用することにより、大腸癌の診断に用いられる臨床検査法において、ヘモグロビンの正しい測定が可能になる。